



12 Patentchrift
10 DE 44 11 594 C 1.

51 Int. Cl. 5:
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/68

21 Aktenzeichen: P 44 11 594.6-41
22 Anmeldetag: 30. 3. 94
43 Offenlegungstag: —
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 14. 12. 95

This document
has been supplied by

NERAC

Phone: 860-872-9331
FAX: 860-875-1749

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:
Deutsches RheumaForschungsZentrum, 14109
Berlin, DE

74 Vertreter:
Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10785
Berlin

72 Erfinder:
Weissensteiner, Thomas, Dipl.-Biochem., London,
GB

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
DE 68 9 07 30 5T2
US 50 23 171

54 Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen

55 Die Erfindung betrifft einen Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen (HLA) in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik, die pharmazeutische Industrie und die molekularbiologische Forschung. Der erfindungsgemäße Testkit enthält Primer, die am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der Allelsequenz homolog sind, und einen Betain-enthaltenden Puffer.

DE 44 11 594 C 1

DE 44 11 594 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitätsantigenen (HLA) in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation.

5 HLA-Allele spielen eine wichtige Rolle bei der Abstoßung von Transplantaten, bei Immun- und Autoimmunreaktionen. Insbesondere HLA-B27 ist stark mit bestimmten Formen von Spondylarthropathien assoziiert und kann helfen, diese frühzeitig von ähnlichen Krankheitsbildern zu unterscheiden.

10 Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Diagnostik, die pharmazeutische Industrie und die molekular-biologische Forschung.

15 Genetische Tests in einem weiten Bereich von Forschung und klinischer Routine werden zunehmend auf der Basis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Damit werden die Tests erheblich verbilligt und außerdem zuverlässiger gemacht. Die PCR ist 1987 entwickelt worden (Mullis, K. B. et al, *Methods in Enzymology* 155, 335 – 342, 1987), mit ihr können kleine Mengen von DNA durch Behandlung von einzelnen komplementären Strängen dieser DNA mit einem molekularen Überschuß von zwei Oligonukleotidprimern und deren Verlängerung zur Bildung einer DNA-Matrize schnell und sicher vermehrt werden (EP-A-200 362, EP-A-201 184, EP-A-258 017).

20 Auch in US 5,023,171 ist ein Verfahren zur Herstellung von rekombinanter DNA unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beschrieben, wobei die rekombinante Doppelstrang-DNA mittels PCR in Gegenwart von oligo-a und oligo-d amplifiziert wird (SOE; gene splicing by overlap extension).

25 Mit Hilfe der PCR werden bereits HLA-Klassell Allele routinemäßig untersucht (Olerup et al, *Tissue Antigens* 39, 225 – 235, 1992).

30 Adrian V. S. Hill et al (*The Lancet*, Vol. 337, March 16, 640 – 642, 1991) benutzten eine HLA-B spezifische PCR und Hybridisierung mit einem B*2703 spezifischen Oligonukleotid und fanden Hinweise, daß dieser für Westafrika (Gambia) charakteristische Subtyp als einziger wahrscheinlich nicht mit Bechterevs Syndrom assoziiert ist.

35 HLA-B spezifische PCR und anschließende Hybridisierung mit Oligonukleotiden Spezifisch für die Subtypen B*2701 bis B*2706 wurde auch von O. Dominguez et al, *Immunogenetics* 36, 277 – 282, 1992 beschrieben.

40 Die Ähnlichkeit zwischen den HLA-Antigenen von Organspendern und -empfängern ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg von Organtransplantationen. Darüberhinaus sind einige Allele dieser Gene mit Resistenz oder Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten assoziiert.

45 B27 weist unter den HLA-Genen eine der stärksten positiven Assoziationen mit zwei überlappenden klinischen Krankheitsbildern auf, Akute Anteriore Uveitis (Baarsma, G. S., 1992, *Current Eye Research*, 11 suppl, 1 – 9) und Spondyloarthropathien (MacLean, L. 1992, *Ann. Rheum. Dis.* 51, 929 – 931).

50 Letztere sind ebenfalls, jedoch schwächer, mit den Antigenen B7, Bw22, B60 (Stein, M. et al, 1990, *J. Rheum.* 17, 1337 – 1339) und eventuell auch B44 (Thomson, G. T. D. et al, 1992, *Clin. Immunology*, 64, 227 – 232) und B62 assoziiert. Das B27-assozierte Risiko für Bechterevs Syndrom erhöht sich ca. dreifach, wenn B60 (B*4001) auf dem anderen HLA-Haplotyp vorhanden ist (Robinson, W. P., 1989, *Arthritis and Rheumatism*, 31, 1135 – 1140).

55 Von den anderen B27-assozierten Krankheitsbildern sind Subformen vorzugsweise mit anderen HLA-Antigen assoziiert. B13, B16 und B17 (B57 und B58) können helfen, "rheumatische" Psoriatische Arthritis von "spondylitischer" (B27) zu unterscheiden (Salvarani, C. et al, 1989, *J. Exp. Rheum.*, 7, 391 – 396; Torre-Alonso, J. C. et al, 1991, *Brit. J. Rheumatol.*, 30, 245 – 250). Eine ähnliche Differenzierung mit Hilfe von B62 ist wahrscheinlich beim Morbus Crohn möglich.

60 B60- und B15-DR4 Haplotypen könnten ebenfalls helfen, Subformen von rheumatischen Erkrankungen zu unterscheiden (Sanders, P. A. et al, 1988, *Tiss. Ant.*, 33, 21 – 29; Charles, P. J. et al, 1991, *Disease Markers*, 9, 97 – 101; Brand, C. A. et al, 1992, *Ann. Rheum. Dis.*, 51, 173 – 176). Der Haplotyp B44-C4A*3C4BQ*O – DR4 kommt vermehrt unter Patienten mit Feltys Syndrom in Rheumatoider Arthritis vor (Hammond, A. et al, 1992, *Clin. Exp. Imm.*, 88, 163 – 168).

65 B60 sowie der Haplotyp B14-DR1 sind außerdem mit milder Formen von 21-Hydroxylasemangel in der nordeuropäischen Bevölkerung assoziiert (Speiser, P. W. et al, 1988, *N. Engl. J. Med.*, 319, 19 – 23; Sinnott, P. J. et al, 1991, *Hum. Genet.*, 87, 361 – 366; Azziz, R. et al, 1991, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 73, 1327).

70 Obwohl in den letzten Jahren verschiedene Varianten der PCR-Reaktion entwickelt worden sind, kann ein sicheres Gelingen dieser Reaktion im allgemeinen nicht vorhergesagt werden. Von wesentlicher Bedeutung ist die Auswahl der zum Aufbau der Matrize geeigneten Primer. Aber selbst wenn die gewünschte Sequenz bekannt und der zur Hybridisierung geeignete Primer ausgewählt ist, ist eine erfolgreiche Amplifizierung noch nicht garantiert. Zahlreiche Beispiele zeigen, daß ein nach Kenntnis der gewünschten Sequenz ausgewählter Primer nicht zur erwarteten Amplifikation geführt hat.

75 Die Erfindung hat das Ziel, einen Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen auf der Basis der PCR-Reaktion zu entwickeln. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, dazu geeignete Primer aufzubauen und die Reaktionsbedingungen so zu gestalten, daß eine sichere Amplifikation gewährleistet ist.

80 Die Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Wesentliches Merkmal sind die im Testkit verwendeten Primer, die am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der gesuchten Sequenz homolog sind, und der erfundungsgemäße Betain-Puffer. Es wurde gefunden, daß Basenmißpaarungen am 3'-Ende des Primers nach der Verlängerung durch Taq-Polymerase störend sind und dabei besonders das letzte Basenpaar entscheidend ist.

85 Mißpaarungen am vierten und den weiteren Basenpaaren vom 3'-Ende entfernt behindern die DNA-Polymerasereaktion praktisch nicht mehr.

90 Die erfundungsgemäßen Testkits enthalten die jeweils spezifischen Primer für einzelne HLA-Antigene gemäß den Ansprüchen 3 – 19.

Nachstehend wird eine Übersicht über die mit den erfundungsgemäßen Testkits bestimmmbaren HLA-B-Allele und die im Testkit enthaltenen erfundungsgemäßen 3'- und 5'-Primer gegeben. Die erfundungsgemäßen Testkits können auch je einen der nachfolgend genannten 3'- und 5'-Primer in anderer als der beschriebenen Kombination enthalten. Daneben sind gleichzeitige Amplifikationen verschiedener Allele und Allelgruppen möglich, wenn mehrere der nachfolgend beschriebenen 3'- und 5'-Primer in derselben Reaktion verwendet werden ("Multiplex-PCR"). Entsprechend können die erfundungsgemäßen Testkits in einer besonderen Ausführungsform auch mehrere 3'- und 5'-Primer beinhalten. 5

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

1. Charakterisierung von Allelgruppen der B7-kreuzaktiven Gruppe mit geringer Auflösung

Primer	B7CREG3	B7CREG2b	B0740R	B0760R
Position	721 - 743	892-918	1446-1465	1490-1506

Produkte

B42 B7 B#40011

Groesse (bp)

615

745

Primer	B7CREG3	B7CREG1b	B7CREG2b	B7CREG2a	B0760R	B0740R
HLA-spezifisch fuer						
B7	N	JA	JA	JA	JA	JA
D8	N	JA	N	N	N	ja (miss3)
D*2701-6	JA	JA	N	N	JA	N
D*2707	JA	JA	N	N	JA	N
B41	JA	N	N	N	ja (miss3)	N
D42	N	JA	JA	JA	JA	ja (miss3)
D*4801	N	JA	N	N	JA	JA
D*4802	?	JA	N	N	JA	JA
D*40011 (B60)	?	N	JA	JA	JA	JA
D*40012 (B60)	JA	N	N	N	JA(n.40.5)	N
D40 (nicht-B60)	JA	N	N	N	JA	N
D73	JA	JA	N	N	JA	N

ja (miss3) : Nur geringfuegig reduzierte Ausbeuten wenn B0760R in Kombination mit einem vollstaendig komplementaeren

S'-Primer verwendet wird

? : Keine Sequenzdaten fuer D*4802 und B*40011 im Bereich von B7CREG3 verfuegbar

n.40.5 : Dcr Subtyp *4005 gehoert nicht der B7-kreuzreaktiven Gruppe an und wird mit B0740R nicht amplifiziert

1.2. Bestimmung HLA-B13, -B14, -B18, -B27, -B73 und von Allelen der serologischen Gruppen B12, Bw22 und Bw21

Primer	B7CREQ3	B7CREG1a	B7CREG2a	B1344L	B27R	B1358R	B1322R	B4445R	D1418R
Position	721 - 743	836 - 852	904-926	938- 957	1250-1269	1274-1289	1306-1327	1459-1478	1470-1490

Produkte

B*2701-2706
B*2701-2706

Groesse (bp)

549
434

oder

B*2701-2706, nicht B*2702

332

B13

390

B54 B55 B56

424

B45 B49 B50

569

oder

B45 B49 B50

607

B45

758

B44

531

B14 B73
B18 B73654
769Amplifikation aller bekannten Subtypen ausser im Falle von B27 (B*2707 : nicht amplifiziert)
Die Primerkombination B7CREQ3/B1322R zeigt geringe, jedoch nicht störende Kreuzreaktivität mit HLA-75, B37 und B73

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Primer	B7CREG3	B7CREG1a	B7CREG2	B1344L	B27R	B2158R	B1322R	B4445R	B1418R
HLA-spezifisch fuer									
B13	N	N		JA	N	N	JA	N	N
B14	N	JA	N	N	N	ja (miss2)	N		
B38; B39 (B16)	N	JA	N	N	N	ja (miss2)	N	N	
B18	JA	N	N	N	N	N	N	JA	
B49; B50 (Bw21)	JA	N	N	N	JA	JA	JA	N	N
B54 (Bw22)	N	N	JA	N	N	JA	JA	N	N
B55; B56 (Bw22)	N	JA	JA	N	N	JA	JA	N	N
B*2701, *2703, *2706	JA	JA	N	ja (miss3)	JA	N	N	N	N
B*2702	JA	JA	N	N	N	N	N	N	N
B*2707		JA	N	ja (miss3)	N	N	N	N	N
B37	JA	N	N	ja (miss3)	N	N	ja (miss2)	N	N
B44 (B12)	N	N	JA	N	N	N	JA	N	N
B45 (B12)	JA	N	N	N	JA	JA	JA	N	N
B*4801	N	JA	N	N	N	N	N	N	N
D*4802	?	JA	N	N	JA	N	N	N	N
B73	JA	JA	N	N	N	ja (miss2)	N	JA	
HLA-75	JA	N	N	N	N	N	ja (miss2)	N	N

ja (miss2) : Nachweisbare PCR-Produkte wenn B22R zusammen mit einem vollstaendig komplementaren 5'-Primer verwendet
 ? : Keine Sequenzdaten fuer B*4802 im Bereich von B7CREG3 verfuegbar

2. Bestimmung von B13, B57 und Allelen der serologischen Gruppe B15

Primer	B15CREG	B57R	B62R	B1122R
Position	838 -855	1248-1269	1256-1261	1306-1327

Produkt Groesse (bp)

B57

432

B*1501, B*1505, B*1507,
B*1517

424

B13

490

B57 : Amplifikation aller bekannten Subtypen

Primer	B15CREG	B57R	B62R	B1122R
HLA-spezifisch fuer				
B13	JA	N	N	
B*1501 (B62)	JA	N	JA	JA
B*1505, B*1507, B*1517	JA	N	JA	N
B57 (B17)	JA	JA	N	N

HLA-B Primensequenzen		Position	Referenz
Primer	Sequenz	(Genbank Release 81.0 (2/94))	X03945
B7CREG1a	5' GCC GCG AGT CCG AGA GA 3'	836 - 852	
B7CREG1b	5' CGC CGG GAG TCC GAG AG 3'	835 - 851	
B7CREG2a	5' GAA CAC ACA GAT CTA CAA GGC CC 3'	904 - 926	
B7CREG2b	5' GTA TTG GGA CCG TAA CAC ACA GAT CTA 3' 892 - 918		
B7CREG3	5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3'	721 - 743	
B4445R	5' CAC CAG GTA TCT GCG GAG CG 3'	1459 - 1468	
B1418R	5' CTC CTT CCC GTA CTC CAG GTG 3'	1470 - 1490	
B2158R	5' GAG GAG GCG CCC GTC G 3'	1274 - 1289	
B1322R	5' TGT AAT CCT TTC CGT CGT AGG CTA 3'	1306 - 1327	
B27R	5' CCA CGT CGC AGC CAT ACA TA 3'	1250 - 1269	
B1344L	5' GAC CGA GAG AAC CTG CGC AC 3'	938 - 957	
B0760R	5' CC GCG CGCTCC AGC TTG 3'	1490 - 1506	
B0740R	5' CGT AGC CAC TCC ACG CACTC 3'	1446 - 1465	
B15CREG1	5' CGC GAG TCC GAG GAT GGC 3'	838 - 855	
B62R	5' CCC CAC GTC GCA GCCC G 3'	1256 - 1271	
B57R	5' CCA CGT CGC ATC CAT ACA TCA C 3'	1248 - 1269	

Primer	Sequenz	Position	Referenz
		(Genbank	Release 81.0 (2/94))
xabl	5' AAC TGC AGA GCG ACT TCC ATT C 3'	9587 - 9608	X71937
xabir	5' AGG TCA TGC AGG GGG TAG TCC A 3'	10579 - 10600	
tnfbl	5' CGT GCT TCG TGC TTT GGA CTA 3'	870 - 890	M16441
tnfbir	5' AGC TGG TGG GGA CAT GTC TG 3'	1588 - 1607	

Als Primer für die internen Kontrollen sind in den erfindungsgemäßen Testkits enthalten:

xabl 5' AAC TGC AGA GCG ACT TCC ATT C 3'

Position 9587 - 9608

5

xabr 5' AGG TCA TGC AGG GGG TAG TCC A 3'

Position 10579 - 10600

10

tnfbl 5' CGT GCT TCG TGC TTT GGA CTA 3'

Position 870 - 890

15

tnfbr 5' AGC TGG TGG GGA CAT GTC TG 3'

Position 1588 - 1607

20

Die erfindungsgemäßen Testkits können die in der PCR bekannten und üblichen Puffer enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform enthalten sie jedoch einen Betain (N,N,N-Trimethylglycin)-Puffer für die PCR-Amplifikation.

Der Puffer kann 200–1000 mM Betain enthalten. Er besteht in einer bevorzugten Variante aus 500–800 mM Betain und 1–6 mM Magnesiumchlorid. In einer weiteren bevorzugten Variante besteht er aus 500–800 mM Betain, 1–6 mM Magnesiumchlorid, 6–14 mM N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin mit pH 8,3 und 80–120 µg/ml Rinder-Serumalbumin V.

Die Auswahl des erfindungsgemäßen Puffers basiert zum einen auf dem Befund, daß bereits geringe Salzkonzentrationen im PCR-Medium die Amplifikation bestimmter HLA-B-Allele negativ beeinflussen können. Der Puffer enthält deshalb im Gegensatz zu den üblichen Puffern kein Kalium- oder Ammoniumchlorid.

Betain kombiniert zudem eine Reihe von Vorteilen herkömmlicher, bisher in der PCR und reversen Transkription (RT) verwendeten Kosolventien:

Es ist chemisch inert und nicht-ionisch, d. h. es kann mit einer Anzahl anderer Kosolvenzien und Salzen kombiniert werden, um optimale Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Primer und Template zu schaffen.

Daneben erleichtert es die Transkription GC-reicher Domänen. Da nur GC-Basenpaare destabilisiert werden, können Primer so gewählt werden, daß ihre Hybridisierung mit der Zielsequenz möglichst wenig beeinträchtigt wird.

Allgemeine Destabilisierung von dsDNA, z. B. durch Glycerin, Dimethylsulfoxid oder Formamid, setzt auch die Hybridisierungstemperatur der Primer herab und hat damit sowohl positive wie negative Auswirkungen auf die Ausbeute von DNA-Polymerase-Reaktionen. Betain ist unter den nicht-ionischen Kosolvenzien einzigartig in seiner Eigenschaft, AT-Basenpaare zu binden und dadurch zu stabilisieren. Da nicht-ionische Kosolvenzien allgemein dsDNA destabilisieren, erfolgt in Anwesenheit von Betain insgesamt eine spezifische Destabilisierung GC-reicher Domänen in DNA und RNA. Betain ist jedoch erheblich billiger als Deoxyguanidin-Analoge wie sie zu diesem Zweck in Sequenzierung und PCR erfolgreich eingesetzt wurden und kann außerdem auch in der RT verwendet werden. AT-reiche Primer wie z. B. (dT)_{12–18} in der RT werden jedoch weniger beeinflußt als GC-reiche Domänen im Templat.

Magnesiumchlorid ist ein essentieller Kofaktor für DNA-Polymerasen, jedoch hängt die optimale Konzentration in der PCR stark von den jeweiligen Primern oder Templaten ab. In Gegenwart von Betain erweitert sich dieser optimale Bereich, wodurch sich die Optimierung, insbesondere von Koamplifikationen ("Multiplex-PCR"), vereinfacht.

Des Weiteren ist bekannt, daß sowohl NaCl als auch Heparin als Verunreinigungen in DNA-Proben auftreten können. So hat Heparin in Konzentrationen zwischen $2.5 \cdot 10^{-4}$ – 10^{-3} U/µl ähnliche Effekte wie NaCl. Im Stand der Technik wurde deshalb Heparinate-Verdau oder Vorbehandlung Heparinenthaltender DNA mit Chelex 100 vorgeschlagen (Francesca Poli, Rosa Catteano, Loretta Crespiatico, Angelea Nocco und Girolamo Sirchia, PCR Methods and Applications, 1993, 2, 356 – 358).

Es wurde nun gefunden, daß die PCR-Ausbeuten, insbesondere von HLA-B, bei Heparin-enthaltenden DNA-Proben in Gegenwart von Betain deutlich verbessert werden können. Vorzugsweise zeigen sich diese Befunde bei Betainkonzentrationen von 500–800 mM. In Gegenwart von 0,8 M Betain werden bis zu 10fach höhere Heparinkonzentrationen toleriert.

Betain macht also die Aufreinigung von Salz- oder Heparinenthaltenden DNA-Proben weitgehend überflüssig, was vor allem in der routinemäßigen Untersuchung klinischer und forensischer Proben von Vorteil ist.

Daneben ist Betain im Gegensatz zu den Kosolvenzien DMSO, Formamid und Methyl-Quecksilberhydroxid ungiftig und ein natürlicher Schutz, den Zellen im Laufe der Evolution gegen thermische und ionische Denaturierung ihrer Proteine entwickelt haben.

Die Aktivität der Taq-Polymerase und der reversen Transkriptase wird durch Betain nicht merklich beeinträchtigt.

Als temperaturstabile DNA-Polymerase wird erfindungsgemäß bevorzugt Taq-Polymerase eingesetzt.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Testkits gegenüber dem Stand der Technik liegen in den folgenden

Punkten

a) Der Betainpuffer macht die Reaktion robuster gegenüber verschiedenen Methoden der DNA-Präparation und NaCl-Verunreinigungen, wie bereits ausgeführt. 5

b) Die erfundungsgemäß eingesetzten Primer sind für maximale Spezifität und Robustheit ausgewählt, wobei folgende Punkte von Bedeutung sind 10

- Erkennung möglichst weniger HLA-Allele,
- soweit möglich Vermeidung von 3'-Desoxy-Thymidin in Primern oder in der komplementären Position auf allen bekannten Allelen der HLA-Klasse I,
- Kontrolle der letzten 10 Nukleotide auf häufige Sequenzmotive im menschlichen Genom (Vergleich mit einer Datenbank menschlicher Sequenzen: Genbank Release 81.0, 2/94) wie z. B. konservierte Strukturen der Immunglobulinfamilie, um die Gefahr von PCR-Artefakten zu verringern. 15

c) Die Zahl der zur B27-Amplifikation benötigten PCR-Cyclen ist geringer als im Stand der Technik. 20

d) Der erfundungsgemäße Kit kann flexibel gestaltet werden, um einige oder mehrere der mit Spondyloarthropathien assoziierten B7-kreuzreaktiven Antigene B60 (B40), B27, Bw22 und B7 sowie die möglicherweise assoziierten Allele B44 und B62 (B15) oder das mit Psoriatischer Arthritis assoziierte Allel B13 zu bestimmen. 25

e) Die internen Kontrollen (Gene XA/XB) beinhalten einen gut dokumentierten Marker für einen HLA-KlassII Locus, durch den in manchen Fällen der mit dem HLA-B Allel assoziierte MHC-Haplotyp eingeschätzt werden kann. 30

f) Die internen Kontrollen wurden sorgfältig ausgewählt (Gene XA/XB oder TNF β) und getestet, um sicherzustellen, daß das HLA-B Produkt unter allen Bedingungen gleich gut oder besser amplifiziert wird. 35

g) Die amplifizierten HLA-B Produkte variieren in ihrer Länge von ca. 400–800 Nukleotiden, so daß die Möglichkeit besteht, mehrere HLA-Bestimmungen im selben Reaktionsvolumen durchzuführen, um so Kosten und Arbeitsaufwand zu sparen. 40

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der erfundungsgemäße Testkit zu einem wesentlichen Fortschritt in der Diagnose von Spondyloarthritis und ähnlichen Erkrankungen führt. 45

Gegenstand der Erfundung ist auch die Verwendung von HLA-Allel-spezifischen Oligodesoxynukleotid-Primern, die am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der Allelsequenz homolog sind, und einem Betain-enthaltenden Puffer zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation und insbesondere zur Amplifikation eines Fragmentes des HLA-B-Gens enthaltend Sequenzen von Exon 2 bis Exon 3. 50

Die Erfundung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden. 55

Ausführungsbeispiele

a) Reaktionsansatz

Die Amplifikationen werden in DNA-Thermocyclern (z. B. dem DNA-Thermocycler 480 der Firma Perkin-Elmer-Cetus) in 500 μ l "Eppendorf"-Reaktionsgefäß durchgeführt. 60

DNA wird durch Verdauung von zu untersuchenden Proben mit Proteinase K und nachfolgende Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen. Zur Reaktion werden Mengen von 50–1000 ng in einem 20 μ l Reaktionsvolumen eingesetzt. 65

Der Ansatz enthält außerdem:

10 mM N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin, pH 8,3 bei 20°C (Tricin)
100 μ g/ml Rinder-Serumalbumin (BSA V)
0,2 mM je Nukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
3 ng/ μ l je Primer
0,025 U/ μ l Taq-Polymerase

mit TNF β als Kontrolle:

600 mM N,N,N-Trimethylglycin (Betain)

55

3 mM Magnesiumchlorid

mit Genen XA/XB als Kontrolle:

800 mM N,N,N-Trimethylglycin (Betain)

60

4 mM Magnesiumchlorid

b) Temperaturschritte

Die PCR-Programme werden in folgenden Temperaturschritten durchgeführt:

65

4' 94 °C Vordenaturierung

B27-PCR

allgemein (einschl. B27)

5	40	Cyclen a'	1' 94 °C	5	Cyclen a'	1' 94 °C
			1' 60 °C			1' 68 °C
10			1' 72 °C			1' 72 °C
				5	Cyclen a'	1' 94 °C
15						1' 64 °C
						1' 72 °C
20				30	Cyclen a'	1' 94 °C
						1' 60 °C
						1' 72 °C

9' 72 °C Primer-Verlängerung

25 Erfnungsgemäß erweisen sich in Gegenwart von Betain Hybridisierungstemperaturen, die ca. 10°C niedriger liegen als die theoretische Denaturierungstemperatur der Primer, und MgCl₂-Konzentrationen zwischen 3 und 4 mM als vorteilhaft.

30 c) Detektion

35 Erfolgreiche Amplifikation der internen Kontrolle und gegebenenfalls eines allel spezifischen HLA-B-Fragments wird durch Elektrophorese in einem 1,5%igen Agarosegel, 0,5 x TBE-Puffer geprüft. DNA-Banden werden durch Anfärbung mit Ethidiumbromid und Fluoreszenz unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht. Die Länge der erhaltenen PCR-Produkte ist eine Kontrolle für die Spezifität der PCR für HLA-B.

d) Ergebnisse

40 HLA-B27, B7, B8, B41, B42, B60, B61 und B73 wurden unter obigen Bedingungen erfolgreich amplifiziert. Die Spezifität der HLA-B PCR wurde mit Hilfe der folgenden Standard-Zelllinien getestet:
Positive Kontrollen waren

45 a) für B27 und seine Subtypen: HOM2, JESTHOM, WT24, LS40 sowie die nicht-standartisierten Linien LH, NW, R69 und Wewak,
b) für B60 (B*40012) : SLE, MADURA, MT14B, PE117, BRU, RLO, LS40 (B27/B60)
c) für B7: HHKB, SAVC, LD2B, R69 (B7/B27)
d) für B8: VAVY, LH (B8/B27)
e) für B42: RSH
50 f) für B41: RLO (B38/B41)
g) für B61 (B*4002): SWEIG.

55 Als Negativkontrolle dienten außerdem zahlreiche weitere, für die häufigsten HLA-B-Allele repräsentative, Standardlinien oder Linien, deren Allelsequenz zu einem der beiden verwendeten Primern vollständig komplementär war (z. B. B14 und B16 mit B7/CREG1 in der B27-PCR).

56 Von 51 sowohl serologisch als auch mit Hilfe der PCR auf HLA-B27 untersuchten Spendern wurde in 43 Fällen positive Übereinstimmung zwischen beiden Tests und in 6 Fällen negative Übereinstimmung gefunden. Eine Probe eines Patienten mit Bechterev war serologisch B27-negativ und positiv anhand des PCR-Ergebnisses. Einmal wurde kein PCR-Produkt von einem serologisch positiven gesunden Spender erhalten. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde weiterhin durch Gelelektrophorese (Größe) und in den Amplifikationsprodukten von 22 verschiedenen vollständig HLA-B typisierten B27-heterozygoten Proben durch Verdau mit Restriktionsenzymen bestätigt.

57 Unspezifische (Co-)Amplifikationen wurden unter den obigen Bedingungen nicht beobachtet.
Um den Einfluß von Tetramethylammoniumchlorid, Betain und NaCl auf die Amplifikation von B7, B8 und B27 zu untersuchen wurden vier Puffer enthaltend 50 mM KCl und 1,5 mM MgCl₂ getestet: zwei handelsübliche (Boehringer Mannheim, Promega) mit Tris sowie zwei eigene mit Tris oder Tricine.

58 Es zeigte sich, daß 50 mM KCl sowie geringe Verunreinigungen mit 5–10 mM NaCl (final) die PCR der HLA-B-Allele der internen Kontrollen erst bei 70 mM NaCl-Konzentrationen behindern. Verbesserte Amplifi-

kation wird jedoch in Gegenwart von 50 mM TMAC1 erzielt und optimale PCR v. n HLA-B7, B8 und B27 bei 0,6–1,0 M Betain- und 2,5–4 mM MgCl₂-Konzentrationen. Oberhalb dieser Grenzen wirkt Betain inhibierend auf eine PCR mit den oben genannten Primern. Während die Amplifikation der internen Kontrollen in Abwesenheit isostabilisierender Substanzen robuster als die HLA-B PCR ist, kehrt sich dieses Verhältnis in Gegenwart von Betain und TMAC1 um.

5

Referenzen für Angaben zur genetischen Position der Primer

Accession-Nummern beziehen sich auf Genbank Release 81.0 (2/94). Die Positionen der HLA-B Primer wurden so angegeben wie sie auf der Sequenz X03945 des Allels HLA-B*2705 liegen würden, ungeachtet von evtl. 3'-Mißpaarungen. Die Länge der PCR-Produkte für die verschiedenen Primerkombinationen wurden ebenfalls so angegeben als ob ein Fragment der Sequenz X03945 amplifiziert würde.

10

a) HLA-B primer : Accession X03945

Authors: Weiss, E. H., Kuon, W., Doerner, C., Lang, M. and Riethmüller, G.

15

Title: Organization, sequence and expression of the HLA-B27 gene:

A molecular approach to analyze HLA and disease associations

Journal: Immunobiology 170, 367–380 (1985)

b) XA/XB Primer : Accession X71937

Authors: Bristow, J., Tee, M. K., Gintelman, S. E., Mellon, S. H. and Miller, W. L.

20

Title: Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B

Journal: J. Cell Biol. 122, 265–278 (1993)

c) TNF β -Primer: Accession M16441

25

Authors: Nedospasov S. A., Shakhev A. N., Turetskaya R. L., Mett V. A., Azizov M. M., Georgiev G. P., Korobko V. G., Dobrynnin V. N., Filippov S. A., Bystrov N. S., Boldyreva E. F., Chuvpilo S. A., Chumakov A. M., Shingarova L. N., Ovchinnikov Y. A.;

Title: "Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) in the human genome";

Journal: Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 51 : 611–624 (1986).

30

d) B*40011: Accession M27540

Authors: Arnot D., Lillie J. W., Auffray C., Kappes D., Strominger J. L.;

Title: "Inter-locus and intra-allelic polymorphisms of HLA class I antigen gene mRNA"; (Figure 3. The nucleotide sequences of the three clones JY103, (LB42, and LB45.)

Journal: Immunogenetics 20 : 237–252 (1984).

35

e) B*40012: Accession M95530

Authors: Kawaguchi, G., Kato, N., Kashiwase, K., Karaki, S., Kohsaka, T., Akaza, T., Kano, K. and Takiguchi, M.

35

Title: Structural analysis of HLA-B40 epitopes

Journal: Hum. Immunol. 36, 193–198 (1993)

40

Patentansprüche

1. Testkit zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen (HLA) in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation, beinhaltend temperaturstabile DNA-Polymerase, eine DNA-Matze, die Desoxynukleotid-5'-triphosphate dATP, dGTP, dTTP und dCTP, einen Puffer für die Polymerase-Kettenreaktion und zwei Allel-spezifische Oligodesoxynukleotid-Primer, dadurch gekennzeichnet, daß der Puffer Betain enthält und die eingesetzten Primer am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelensequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der Allelensequenz homolog sind.

45

2. Testkit nach Anspruch 1 zur Bestimmung von HLA-B-Allelen.

50

3. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B27 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CCA CGT CGC AGCCAT ACA TA 3',

55

spezifisch für die Allele B*2701, B*2702, B*2703, B*27051, B*27052, B*2706 und entweder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GCC GCG AGT CCG AGA GA 3',

60

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B14, B*1509, B*1510, B16, B27, B42, BSS, B56, B73 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGC CGC GAG TCC GAG AG 3',

65

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B14, B*1509, B*1510, B16, B27, B42, B48, B54, B55, B56, B73, B79 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CTC CCA CTC CAT **GAG** GTA TTT CC 3',
 spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 beinhaltet.

5 4. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung der B27-Subtypen B*2701, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706 und zur Unterscheidung dieser Subtypen von B*2702, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GAC CGA GAG AAC CTG CGC AC 3',
 10 spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B27 (mit Ausnahme des Subtyps B*2702), B37, B44, B47 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

15 5' CCA CGT CGC AGC CAT ACA TA 3',
 spezifisch für die Allele B*2701, B*2702, B*2703, B*2704, B*27051, B*27052, B*2706 beinhaltet.
 5. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B44 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

20 5' GAC CGA GAG AAC CTG CGC AC 3',
 spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B27 (mit Ausnahme des Subtyps B*2702), B37, B44, B47 beinhaltet und der 3'-Primer die Sequenz

25 5' CAC CAG GTA TCT GCG GAG CG 3',
 aufweist.
 6. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B45 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

30 5' CTC CCA CTC CAT **GAG** GTA TTT CC 3',
 spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

35 5' CAC CAG GTA TCT GCG GAG CG 3',
 beinhaltet.
 7. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B7 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

40 5' GTA TTG GGA CCG TAA CAC ACA GAT CTA 3',
 spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B*40011, B42, B54, B55, B56 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

45 5' CGT AGC CAC TCC ACG CAC TC 3',
 spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B13, B27, B40, B47, B*4801, B73 beinhaltet.
 50 8. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung der B7-Subtypen B*0701, B*0702 und zur Unterscheidung dieser Subtypen von B*0703, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

55 5' GTA TTG GGA CCG TAA CAC ACA GAT CTA 3',
 spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*0701, B*0702, B*40011, B42, B54, B55, B56 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

60 5' CGT AGC CAC TCC ACG CAC TC 3',
 spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B13, B27, B40, B47, B*4801, B73 beinhaltet.
 9. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-Bw22 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

65 5' GAA CAC ACA GAT CTA CAA GGC CC 3',
 spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*0701, B*0702, B42, B54, B55, B56 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' TGT AAT CCT TTC CGT CGT AGG CTA 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B45, B49, B50, B54, B55, B56 beinhaltet
 10. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B13 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er
 einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' TGT AAT CCT TTC CGT CGT AGG CTA 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B45, B49, B50, B54, B55, B56 und entweder einen
 10. 5'-Primer mit der Sequenz

5' GAC CGA GAG AAC CTG CGC AC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B13, B27 (mit Ausnahme des Subtyps B*2702), B37,
 15 B44, B47 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGC GAG TCC GAG GAT GGC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*1501, B*1502, B*1504, B*1505, B*1506, B*1507,
 20 B*1516, B*1517, B13, B46 und B57 beinhaltet.
 11. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung der HLA-Allele B14, B18 oder B73, dadurch gekenn-
 zeichnet, daß er einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CTC CTT CCC GTA CTC CAG GTG 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B14, B18, B*5101, B*5103, B*5104, B52 und B73
 sowie zur Amplifikation von B14 und B73 einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GCC GCG AGT CCG AGA GA 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B14, B*1509, B*1510, B16, B27, B42, B48, B54,
 30 B55, B56, B73 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGC CGC GAG TCC GAG AG 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B14, B*1509, B*1510, B16, B27, B42, B48, B54,
 35 B55, B56, B73, B79 beinhaltet sowie zur Amplifikation von B18 und B73 einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 beinh-
 altet.

12. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur spezifischen Amplifikation der Allele und serologischen Spezifitäten
 Bw21 oder B45, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' GAG GAG GCG CCC GTCG 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B35, B45, B*4802, B49, B50, B53 und B58 sowie einen
 50 5'-Primer mit der Sequenz

5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 beinh-
 altet.

13. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung des Allels B*4001 unter Verwendung B41/B*4001-spe-
 55 zifischer Amplifikation, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CTC CCA CTC CAT GAG GTA TTT CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B18, B27, B37, B40, B41, B45, B49, B50, B73 sowie
 60 einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CC GCG CGC TCC AGC TTG 3',

spezifisch für B7, B8, B*40011, B*40012, B41, B42 und B*4801 beinhaltet.

14. Testkit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß zur Unterscheidung von B*40011 und B41
 durch Reamplifikation des mit den Primern aus Anspruch 13 erhaltenen PCR-Produktes ein 3'-Primer mit
 der Sequenz

5' CGT AGC CAC TCC ACG CAC TC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B13, B27, B40, B47, B*4801, B73 enthalten ist.
 5. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung der Allelgruppe B*1501, B*1505, B*1507 und B*1517, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGC GAG TCC GAG GAT GGC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*1501, B*1502, B*1504, B*1505, B*1506, B*1507, B*1516, B*1517, B13, B46 und B57 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CCC CAC GTC GCA GCC G 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*1501, B*1505, B*1507, B*1509, B*1510, B*1517, B7, B8, B16 B18, B*2707, B*3505, B*4001, B*4002, B*4003, B*4005, B42, B*4401, B*4402, B*4403, B*4405, B*4801, B*5602, B79 beinhaltet.

16. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung des Allels B42 unter Verwendung B7/B42-spezifischer Amplifikation, dadurch gekennzeichnet, daß er entweder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GAA CAC ACA GAT CTA CAA GGC CC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*0701, B*0702, B42, B54, B55, B56 oder einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' GTA TTG GGA CCG TAA CAC ACA GAT CTA 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B42, B54, B55, B56 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CC GCG CGC TCC AGC TTG 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B7, B8, B*40011, B*40012, B41, B42 und B*4801, beinhaltet und die Abwesenheit von B*0701/B*0702 durch das Primerpaar nach Anspruch 8 ausgeschlossen wird.

17. Testkit nach Anspruch 1 oder 2 zur Bestimmung eines HLA-B57 Allels, dadurch gekennzeichnet, daß er einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGC GAG TCC GAG GAT GGC 3',

spezifisch für die Allele und serologischen Spezifitäten B*1501, B*1502, B*1504, B*1505, B*1506, B*1507, B*1516, B*1517, B13, B46 und B57 und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' CCA CGT CGC ATC CAT ACA TCA C 3',

spezifisch für das Allel der serologischen Spezifität B57 beinhaltet.
 18. Testkit zur Bestimmung von HLA-B-Allelen und Allelgruppen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er je einen der in den Ansprüchen 3 bis 17 genannten 3'-Primer und je einen der in den Ansprüchen 3 bis 17 genannten 5'-Primer in beliebiger Kombination enthält.

19. Testkit nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß er mehrere der in den Ansprüchen 3 bis 17 genannten 3'- und 5'-Primer zur gleichzeitigen Amplifikation verschiedener Allele und Allelgruppen in derselben Reaktion enthält ("Multiplex-PCR").

20. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß er als interne Kontrolle zur Amplifikation eines Fragments des Gens XB und, in den entsprechenden MHC-Haplotypen, zusätzlich des Gens XA einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' AAC TGC AGA GCG ACT TCC ATT C 3',

und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' AGG TCA TGC AGG GG TAG TCC A 3',

beinhaltet.

21. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 5, 7 bis 10, 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß er zur Amplifikation eines Fragments des Gens TNF β als interne Kontrolle einen 5'-Primer mit der Sequenz

5' CGT GCT TCG TGC TTT GGA CTA 3',

und einen 3'-Primer mit der Sequenz

5' AGCTGGTGGGACATGTC TG 3',

beinhaltet.

22. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß er als thermostabile DNA-Polymerase Taq-Polymerase enthält. 5

23. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Puffer 200–1000 mM Betain enthält.

24. Testkit nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß der Puffer 500–800 mM Betain und 1–6 mM Magnesiumchlorid enthält.

25. Verwendung von HLA-Allel-spezifischen Oligodesoxynukleotid-Primern, die am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der Allelsequenz homolog sind, und einem Betain-enthaltenden Puffer zur Bestimmung von Histokompatibilitäts-Antigenen in DNA-Proben durch spezifische PCR-Amplifikation. 10

26. Verwendung gemäß Anspruch 25 zur Amplifikation eines Fragmentes des HLA-B Gens enthaltend Sequenzen von Exon 2 bis Exon 3. 15

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65